

SVEUČILIŠTE U ZAGEBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

OKSIDACIJSKI STRES I EPIGENETSKA REGULACIJA U  
KRONIČNIM BOLESTIMA

OXIDATIVE STRESS AND EPIGENETIC REGULATION IN  
CHRONIC DISEASE

SEMINARSKI RAD

Dominik Herek

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Zagreb, 2019.

# SADRŽAJ

1. Uvod .....	2
2. Epigenetska regulacije ekspresije gena .....	2
2.1.Acetilacija i deacetilacija histona .....	3
2.2.Oksidacijski stres i starenje .....	7
3. Poremećaji u epigenetskoj regulaciji u nastanku i progresiji raka .....	9
4. Oksidacijski stres u kroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća .....	12
5. Oksidacijski stres i epigenetska regulacija u ostalim bolestima .....	14
6. Zaključak .....	15
7. Literatura .....	15
8. Sažetak .....	16
9. Summary .....	16

# 1. Uvod

U proučavanju kroničnih bolesti cilj je dugo vremena bio na genetici i genetičkim čimbenicima koji ih uzrokuju, no u novije vrijeme sve više i više se očituje velika uloga epigenetike i epigenetske regulacije ekspresije gena. Istraživanja se također usmjeravaju na čimbenike koji utječu na epigenetsku regulaciju, a jedan od glavnih, koji ima veliku ulogu i u procesima starenja i pripadajućim bolestima, je oksidacijski stres. Kombinacije ovih čimbenika uzrokuju poremećaje u normalnoj ekspresiji gena te uzrokuju ili potiču razvoj bolesti i upalnih stanja koje dalje omogućuju oštećenja genoma i razvoj brojnih signalnih procesa u stanici. Mnoga istraživanja se provode upravo sa svrhom boljeg razumijevanja ovih procesa radi izrade novih i boljih terapija.

U ovom radu će se proći kroz kratki opći pregled mehanizama epigenetske regulacije ekspresije gena te oksidacijskog stresa i njihove povezanosti sa starenjem i kroničnim bolestima. Također će se proći kroz nekoliko primjera poremećaja epigenetske regulacije u određenim bolestima i kroz utjecaj oksidacijskog stresa na bolesti povezane sa starenjem.

## 2. Epigenetska regulacija ekspresije gena

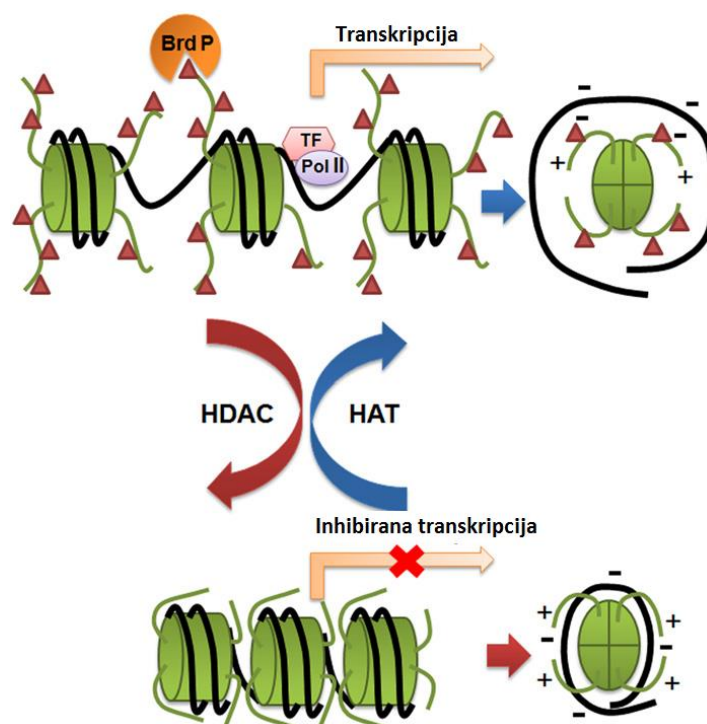
DNA u svom prirodnom obliku u kromatinu, namotana na histone, nije dostupna za transkripciju. Epigenetika obuhvaća nasljedne promjene ekspresije gena bez promijene primarnog slijeda DNA. Ovo je postignuto mehanizmima kovalentne modifikacije kromatina i post-translacijskih modifikacija. Modifikacije kromatina koje omogućuju regulaciju transkripcije gena su metilacija DNA i post-translacijske modifikacije histona. Metilaciju DNA provodi DNA metil-transferaze koje kataliziraju dodavanje metilne skupine na fosfodieterske veze između otoka cisteina i gvanina (CpG). DNA metilacija utišava gene, odnosno, smanjuje njihovu ekspresiju. Post-translacijske modifikacije histona uključuju acetilaciju, deacetilaciju, fosforilaciju, poli-adenozin-3',5'-difosfat (ADP)-ribolizaciju, ubikvitinaciju i mikro RNA (miRNA) (Sharma i sur., 2010; Malireddy i sur., 2012; Tsai i sur., 2016).

Tijekom raznih kroničnih bolesti i upalnih procesa te procesa starenja, kod kojih veliku ulogu igra upravo oksidacijski stres, epigenetska regulacija je poremećena, što dovodi do abnormalne ekspresije gena i na posljeticu do fenotipa određene bolesti. Mnogi lijekovi ciljaju

upravo na ove mehanizme s namjerom da povrate normalnu epigenetsku regulaciju (Cencioni i sur., 2013).

## 2.1 Acetilacija i deacetilacija histona

Osim histona mogu se acetilirati i deacetilirati i neki drugi proteini, kao npr. neki transkripcijski čimbenici (engl., *Nuclear Factor- $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) (Schreck i sur., 1992). Pronađeno je oko 60 različitih acetiliranih proteina osim histona. Sva ova acetilirana mjesta proteina u stanici nazivaju se acetilom. Novije analize pokazale su da se u jednoj stanici nalazi oko 2000 acetiliranih proteina s oko 3600 acetiliranih mjesta (Parbin i sur., 2014).

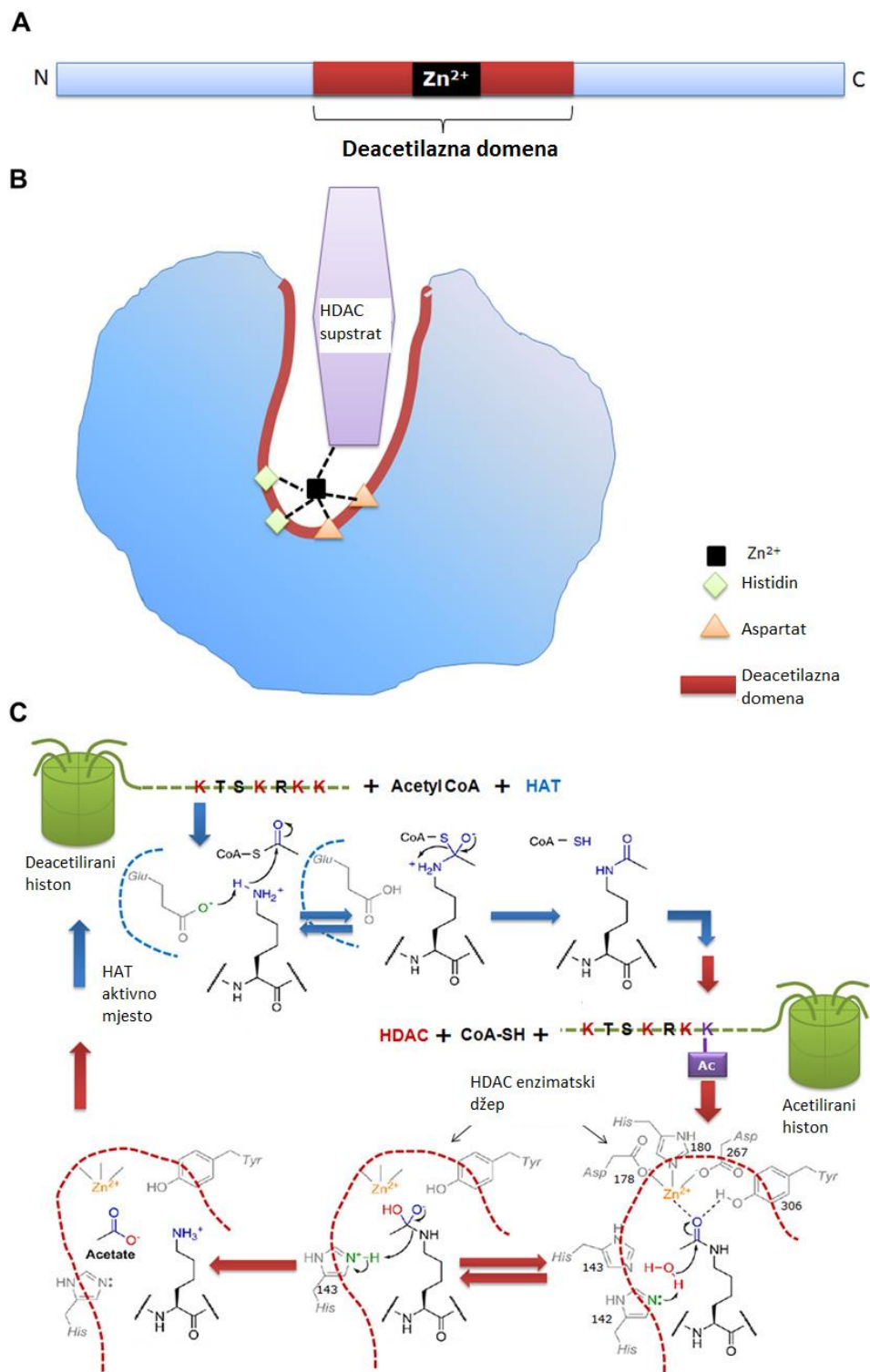


**Slika1.** Regulacija transkripcije acetilacijom i deacetilacijom histona. Preuzeto i prilagođeno od Parbin i sur., 2014.

Acetilacija histona, kao i sve druge modifikacije, odvijaju se N-terminalnom repu, a stupanj acetilacije određuje razinu ekspresije gena pa će jače acetilirani histoni omogućavati veću ekspresiju. Acetilacija histona bazira se na dodavanju acetilne skupine na  $\epsilon$ -amino kraju aminokiselinskog ostatka lizina u repnoj domeni srži histona. Ove acetilacije se uglavnom odvijaju na histonima H3 i H4. Zbog acetilacije se neutralizira pozitivni naboj histona te se

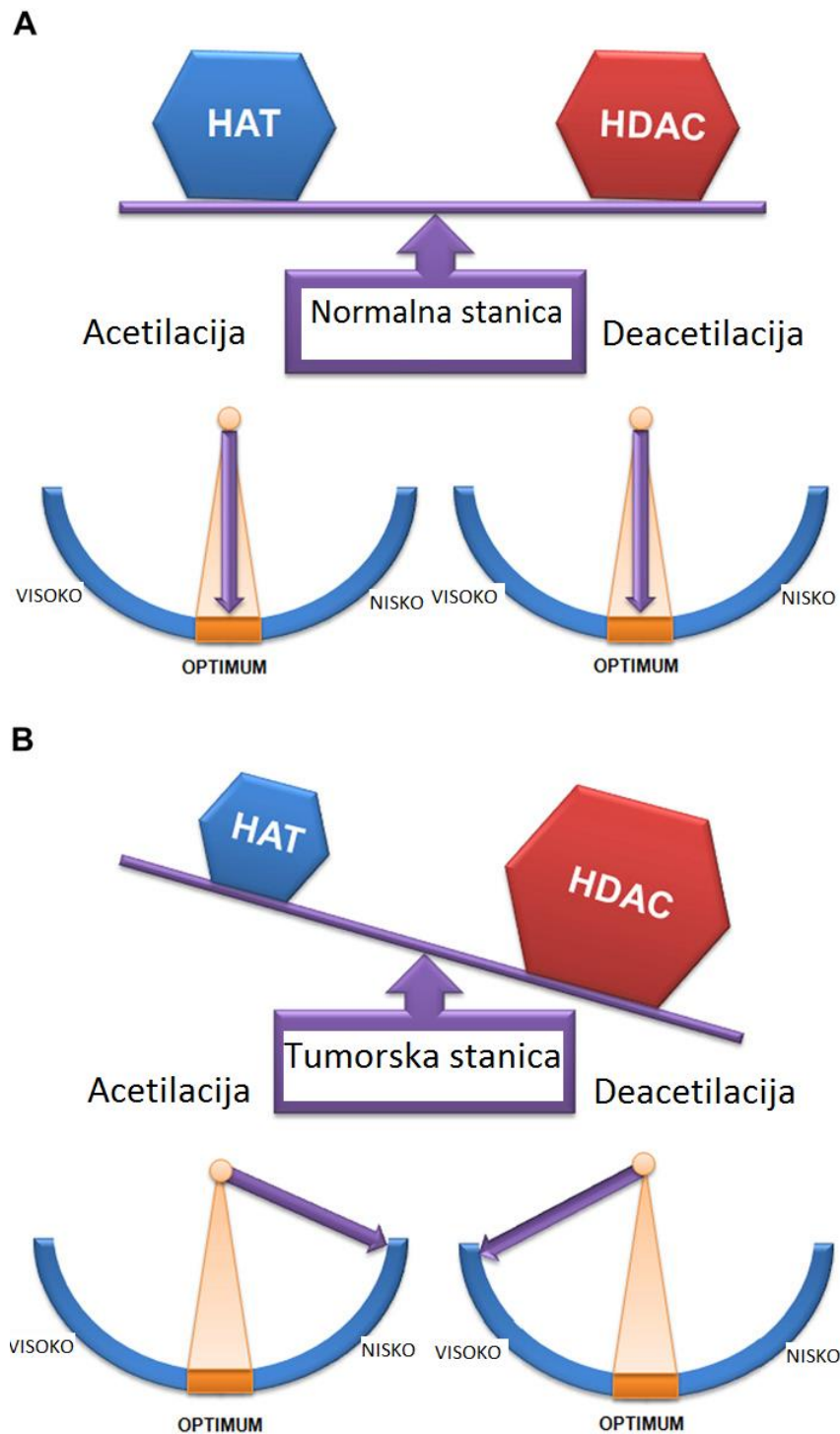
oslabljuju elektrostatske međureakcije između histona i DNA. Na taj način se heterokromatin pretvara u eukromatin. Transkripcijski aktivni eukromatin ima slabije namotanu DNA na histone upravo zbog ovih slabijih elektrostatskih međureakcija. Na ovakav opušteni i otvoreni kromatin lako se može vezati transkripcijska mašinerija (Slika 1.). Acetilacija i deacetilacija odvijaju se pomoću dvije vrste antagonističkih enzima. Histon acetil transferaze (HAT) i histon deacetilaze (HDAC). Ove grupe enzima održavaju ravnotežu acetilacije i deacetilacije, poznatu kao homeostazu acetilacije, kojom je regulirana ekspresija gena u stanici. HAT i HDAC grupe enzima rade po poznatom mehanizmu detaljnije prikazanom na Slici 2. Tijekom bolesti i raznih upalnih procesa koji mogu biti izazvani i oksidacijskim stresom, ova ravnoteža HAT i HDAC aktivnosti se poremećuje (Slika 3.) te se mnogo lijekova temelji upravo na vraćanju acetilacijske homeostaze (Esteller, 2007; Parbin i sur., 2014).

Jedanaest histon deacetilaza, o kojima ćemo dalje više govoriti, dijele se u četiri velike klase, a klasa II se dodatno dijeli na IIa i IIb podklase. Od tih, klase I, II, i IV smatraju se klasičnim histon deacetilazama, odnosno, cink ovisne amidohidrolaze (HDAC 1 - 11). Svaki od ovih enzima sadrži aktivno mjesto veličine oko 390 aminokiselina koje tvori uski džep na čijem dnu je  $Zn^{2+}$  ion vezan na histidinske i aspartatne aminokiselinske ostatke. Zbog ovog, možemo ih inhibirati pomoću  $Zn^{2+}$  kelatirajućih spojeva, npr. hidroksamičnom kiselinom. Novije otkrivena klasa III sastoji od sedam sirtuina (SIRT 1 - 7) koji su zapravo  $NAD^+$  ovisni enzimi te za njihovu inhibiciju trebamo koristiti neke druge spojeve. Detaljniji filogenetski odnosi ovih enzima prikazani su na Slici 4 (Chi i sur., 2010; Parbin i sur., 2014).



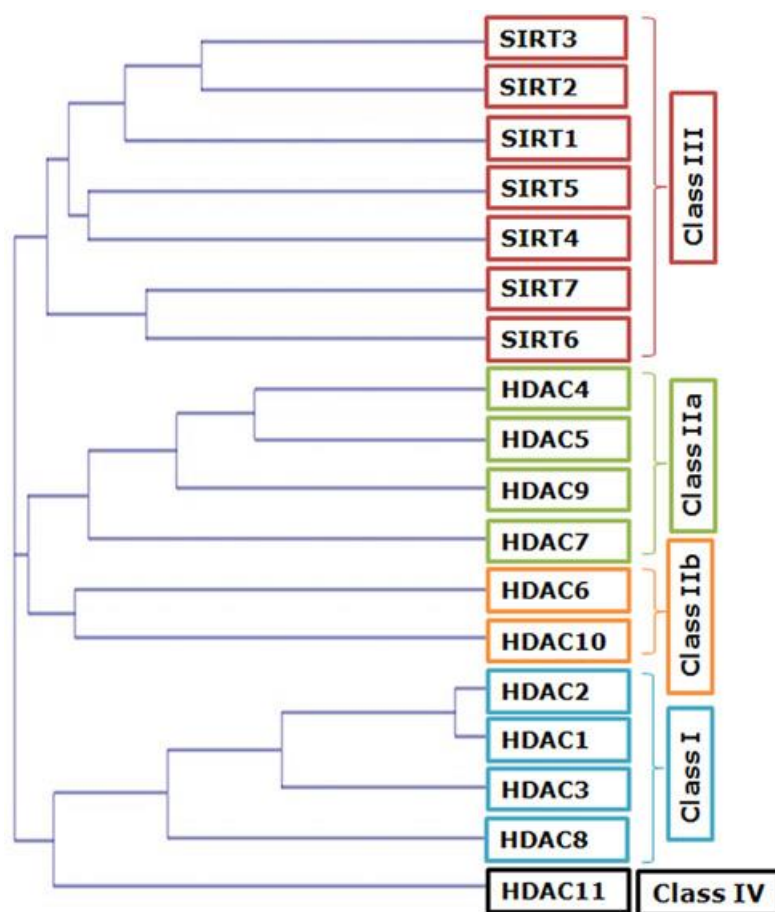
**Slika 2.** Kratak prikaz strukture histon deacetilaza (A, B) i mehanizmi djelovanja HAT i HDAC (C).

Preuzeto i prilagođeno od Parbin i sur., 2014.



**Slika 3.** Shematski prikaz acetilacijske ravnoteže u normalnoj stanici (A) i tumorskoj stanici (B).

Preuzeto i prilagođeno od Parbin i sur., 2014.



**Slika 4.** Filogenetsko stablo HDAC klasa. Preuzeto i prilagođeno od Parbin i sur., 2014.

## 2.2 Oksidacijski stres i starenje

Oksidacijski stres je poznati čimbenik u nastanku i napredovanju mnogih bolesti i poremećaja uključujući razne srčane i bolesti krvožilnog sustava, živčane i moždane bolesti, bolesti bubrega i pluća te razne infekcije i pretilost te starenje. Oksidacijski stres nastaje raznim mehanizmima, a potiču ga mnogi okolišni, toksični i prehrambeni čimbenici. Mogu ga uzrokovati vanjski ili unutarnji (unutar stanični) oksidansi. Uzročnici oksidacijskog stresa su reaktivne vrste kisika (engl., *Reactive Oxygen Species*, ROS), u koje spadaju hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) i molekularni kisik ( $\text{O}_2$ ), i reaktivne vrste dušika (engl., *Reactive Nitrogen Species*, RNS) i drugi oksidansi (Cencioni i sur., 2013).



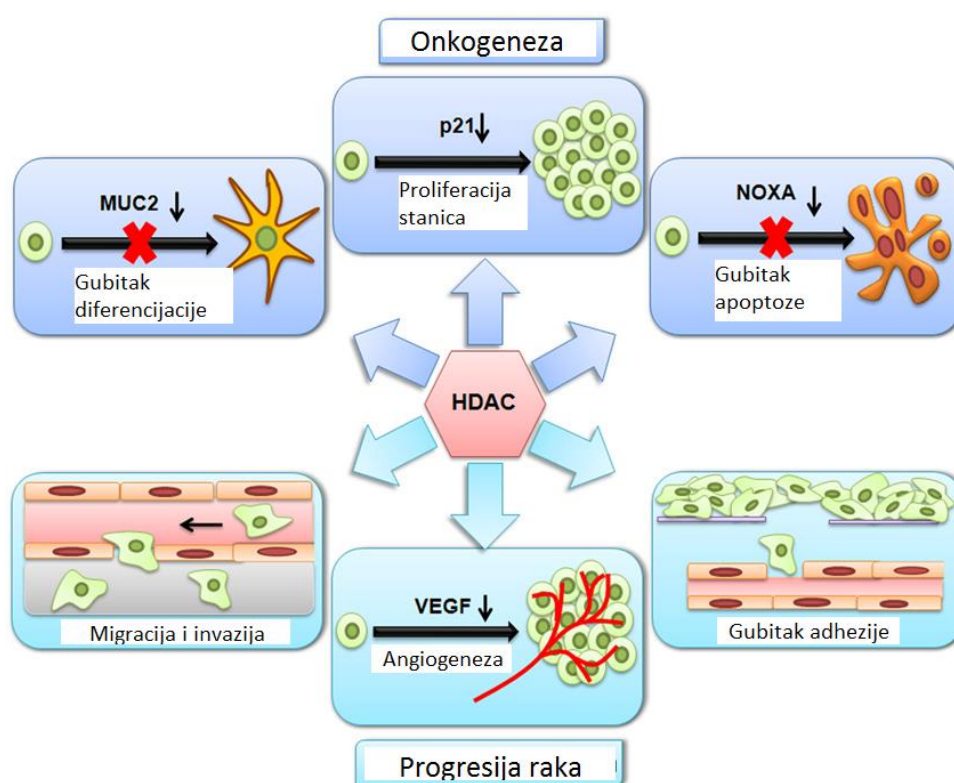
Jedan od glavnih mehanizama preko kojeg oksidacijski stres može djelovati je napad na membranske lipide koji sadrže polinezasićene masne kiseline, proteine i nukleinske kiseline. Ovaj učinak je dodatno pojačan zbog nastanka unutarstaničnih oksidanasa u blizini stanične membrane. Posljedica ovog često je i deaktivacija raznih membranskih receptora uslijed oštećenja membrane (Rahman i sur., 2006). Jedan od dobro poznatih lipidnih derivata nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa je 4-hidroksil-2-nonenal (4-HNE). Ovaj derivat se ponaša kao elektrofil te napada DNA i proteine, a 4-HNE pokazano reagira s deacetilazom SIRT 3 u mitohondrijima tako da inhibira njezino djelovanje te na taj način utječe na epigenetsku regulaciju. Ovo je samo jedan od mnogih primjera sličnih mehanizama koji se javljaju pri razvoju i tijeku prije navedenih bolesti (Malireddy i sur., 2012).

Osim elektrofilnih napada, oksidacijski stres također narušava redoks ravnotežu u stanici. Jedan od glavnih čimbenika u odražavanju redoks stanja u stanici je glutation (GSH, ili u oksidiranom stanju gdje tvori dimere, GSSG). Uloga GSH redoks sustava je antioksidativna, odnosno, cilj je zaštititi metaboličku mašineriju od prirodno nastalih oksidansa koji su nusprodukti metabolizma stanice. Postoje mnogi enzimatski i neenzimatski mehanizmi obrane od oksidanasa, ali je upravo GSH sustav jedan od važnijih. Ipak, ni ti sustavi ne mogu se nositi s povećanom količinom oksidanasa pri oksidacijskom stresu, pogotovo ako su uključeni neki vanjski čimbenici (npr. dim cigarete, UV zračenje i sl.). U takvim situacijama dolazi do oštećenja raznih staničnih struktura i mehanizama te je upravo ovo jedan od glavnih načina nastanka bolesti. Novija istraživanja sve više pokazuju veliku ulogu oksidacijskog stresa na epigenetsku regulaciju i ekspresiju gena te njihovu ulogu u bolesti (Rahman i sur., 2006, Malireddy i sur., 2012).

Starenje je definirano kao višestruko ireverzibilno nakupljanje fizičkih, okolišnih i socijalnih promjena. Tijekom starenja organizama mnogi fiziološki procesi postaju više ne učinkoviti i homeostatski mehanizmi polako slabe. U početku se uglavnom samo gledalo na genetske mehanizme starenja, ali je u novije vrijeme sve jasnija važna epigenetska uloga. Jedna od teorija koja objašnjava ove procese je teorija starenja slobodnih radikala koja govori da je starenje posljedica nakupljanja oksidativnih oštećenja u stanicama. Jedni od glavnih sustava koji se oštećuju oksidacijskim stresom su upravo sustavi popravaka što dodatno pridonosi starenju i nastanku bolesti (Cencioni i sur., 2013).

### 3. Poremećaji epigenetske regulacije u nastanku i progresiji raka

Histon deacetilaze igraju veliku ulogu u svim fazama nastanka i napretka mnogih rakova. Povećana HDAC aktivnost ili smanjena HAT aktivnost pomiču ravnotežu acetilacije prema deacetilaciji, a to ujedno i mijenja ekspresiju gena. Te promjene na šest karakterističnih načina uzrokuju, odnosno, potiču razvoj raka (Slika 5.). Povećana HDAC aktivnost uzrokuje proliferaciju stanica, inhibira apoptozu i uzrokuje dediferencijaciju te na taj način potiče nastanak raka, a poticanjem angiogeneze, gubitkom adhezije i migracijom i invazijom (direktni prodor tumorskih stanica u susjedna tkiva) stanica potiče njegov razvoj. Ovo se događa jer se deacetiliraju histoni uz tumor supresorske gene pa se njihova ekspresija smanjuje ili potpuno prestaje. To su uglavnom geni koji kontroliraju stanični ciklus i diferencijaciju stanica (Chi i sur., 2010; Parbin i sur., 2014).



**Slika 5.** Načini djelovanja pojačane deacetilacije u onkogenezi i progresiji raka. Preuzeto i prilagođeno od Parbin i sur., 2014.

Utišavanjem gena za kontrolu ciklusa, stanice se mogu nekontrolirano dijeliti, odnosno, proliferirati, a upravo to je jedna od najvažnijih značajki tumorskih stanica. Uglavnom se radi o genima za p21 i p27, odnosno, za selektivne inhibitore ciklin ovisnih kinaza. Bez ove kontrole staničnog ciklusa moguća je nekontrolirana dioba stanica bez obzira na uvjete. Također je važan transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl., *Transforming growth factor* –  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) koji djeluje kao signal za inhibiciju rasta stanica, a veže se za receptore TGF- $\beta$ RI i TGF- $\beta$ RII. Ovi receptori su kod rakova, posebno raka pluća, slabo eksprimirani, što opet dovodi do proliferacije stanice. U ovom slučaju se deacetilacija događa na promotorskoj regiji gena za receptore (Parbin i sur., 2014).

Za diferencijaciju gastrointestinalnih stanica važni su visoko glikozilirani proteini mucini, posebno mucin 2 (Muc2). Promotri ovih gena su pri nastanku tumora gušterače i debelog crijeva deacetilirani te su na taj način geni utišani. Kod hematopoetskih stanica, transkripcijski čimbenik Runx1-ETO (ili AML1-ETO), koji nastaje translokacijom t(8:21), veže HDAC 1, 2 i 3. Ovakav kompleks djeluje deacetilirajuće na mnoge gene za kontrolu diferencijacije granulocita (Bcl-2, CEBPA, p14ARF, c-fms) te to uzrokuje akutnu mijeloidnu leukemiju (Parbin i sur., 2014).

Za apoptozu raznih tumora važni su TNF- $\alpha$  vezani ligandi (engl., *Tumor Necrosis Factor*  $\alpha$ ). Deacetilacijom se smanjuje ekspresija raznih receptora za TRAIL (engl., *TNF- $\alpha$  related apoptosis inducing ligand*) te tako stanice tumora izbjegavaju signal za apoptozu. Neki od važnijih gena koji su utišani u ovom procesu su NOXA, DR5, DR4, p53 i dr. Uz deacetilaciju, ovdje ulogu igra i regulacija metilacije same DNA (Parbin i sur., 2014).

Osim za nastanak tumora, poremećaji acetilacije u korist deacetilacije imaju važnu ulogu i u razvoju, progresiji i metastaziranju tumora. Kod mnogih tumora se očituje MRES (engl., *multiple regional epigenetic silencing*) fenotip koji se javlja uz epigenetsko utišavanje nekoliko kromosomskih regija. Ovakav fenotip snažno korelira s *in situ* ekspresijom gena u tumorskim stanicama te se često javlja kod više agresivnih tumora (Vallot i sur., 2010). Ovdje važni geni koji kontroliraju angiogenezu i metastaziranje pod velikim su utjecajem histon deacetilaza. Uz deacetilaciju histona, ulogu igra i njihova metilacija, ali ovdje ćemo se bazirati na deacetilaciju (Parbin i sur., 2014).

Angiogeneza je proces nastanka novih krvnih žila od već postojećih te je vrlo važan proces u progresiji i solidnih i krvnih tumora. Angiogenezu potiču hipoksični uvjeti koji se javljaju u sredini solidnih tumora, a krvne žile su važne za dovod kisika i hranjivih tvari te

odstranjivanja CO<sub>2</sub> i otpada iz hipoksičnih centara tumora. Ovaj proces povezan je s deacetilazama preko inducibilnog čimbenika hipoksije 1α (engl., *hypoxia inducible factor-1α*, HIF-1α). U normalnim stanicama ovaj protein je acetiliran i hidroskiliran te se razgrađuje von Hippel–Lindau (VHL) ovisnom razgradnjom, ali u hipoksičnim uvjetima biva deacetiliran. U ovoj aktivnoj formi HIF-1α potiče ekspresiju vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl., *vascular endothelial growth factor*, VEGF), koji dalje potiče angiogenezu. Ova deacetilacija se događa uz dodatno utišavanje p53 i VHL gena koji bi pomogli u sprječavanju angiogeneze. Istraživanjima je pokazano da se u hipoksičnim tumorskim stanicama *in vivo* nalazi još veća količina histon deacetilaza, posebno HDAC1 (Parbin i sur., 2014).

Glavno obilježje kod metastaze je nemogućnost stanica da pravilno međureagiraju s okolinom i drugim stanicama. Negativna regulacija ekspresije cistatina, inhibitora peptidaza, povezana je s invazijom tumora, a za utišavanje cistatina odgovoran je HDAC1. E-kadherin (CDH1), jedan od međustaničnih proteina za adheziju, također biva utišan histon deacetilazama, ali ne direktno. Histon acetilaze djeluju na više transkripcijskih represora (slug, snail, ZEB, itd.) koji zatim utišavaju ekspresiju CDH1. Bez funkcije CDH1 tumorske stanice lako prelaze iz epitela u mezenhim te se na taj način šire (Parbin i sur., 2014).

Neki od važnijih transkripcijskih čimbenika na koje direktno djeluju histon deacetilaze, a inače imaju antitumorsku ulogu, su p53, Runx3, GATA, Sp1, CEBPA, NF-κB i STAT-ovi. Transkripcijski čimbenik p53 ima posebno veliku antitumorsku ulogu jer sudjeluje u kontroli staničnog ciklusa i apoptoze stanice. U acetiliranom obliku p53 može lako vršiti međureakciju s DNA te na taj način djeluje, posebno nakon oštećenja DNA. Pod povećanim utjecajem histon deacetilaza inhibira se p53-DNA međureakcija te se na taj način sprječava njegovo djelovanje. Transkripcijski čimbenik NF-κB također ima važnu ulogu u staničnoj regulaciji (Parbin i sur., 2014).

Osim ovih transkripcijskih čimbenika, i neki citosolni proteini dio su acetiloma te imaju ulogu u onkogenezi i progresiji. Neki od njih su signalne molekule za apoptozu kao što je npr. Ku70. Ovaj citoplazmatski protein potiče slanje signala za apoptozu u mitohondrij, ali u deacetiliranom stanju je ta funkcija inhibirana. Još jedan važan protein je HSP90 (engl., *Heat shock protein-90*), koji se veže na onkogene proteine te potiče njihovu razgradnju ubikvitinacijom. Kada je deacetiliziran, ne može se vezati za te proteine te oni ostaju stabilni. Neke deacetilaze mogu djelovati i na tubulin pa tako nastaju dinamični mikrotubuli koji potiču pomicanje stanica, odnosno, migraciju, tj. Nastanak metastaza (Parbin i sur., 2014).

Na ove neenzimatske proteine bilo je vrlo teško djelovati lijekovima jer nemaju aktivno mjesto koje bi moglo biti inhibirano, ali otkrićem učinka deacetilacije omogućen je cijeli niz novih terapija koje ciljaju upravo na inhibiciju histon deacetilaza te na taj način pokušavaju liječiti ove bolesti. Postoji cijeli niz tvari koje inhibiraju sve vrste histon deacetilaza te se provodi sve više i više istraživanja o njihovom potencijalnom učinku na razne vrste rakova. Mnoga istraživanja daju obećavajuće rezultate na raznim životinjskim modelima i staničnim kulturama (Parbin i sur., 2014).

#### 4. Oksidacijski stres u kroničnoj opstruktivnoj bolesti pluća

Kronična opstruktivna bolest pluća (engl., *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) naziv je za više kroničnih plućnih bolesti (emfizem, bronhitis, neke vrste astme, itd.) koje se trenutno ne mogu izliječiti, ali se raznim lijekovima mogu kontrolirati simptomi (<https://www.copdfoundation.org/What-is-COPD>). Oksidacijski stres igra veliku ulogu u poticanju i održavanju upalnih procesa u stanicama pluća i dišnih puteva te je jedan od velikih čimbenika kod COPD-a. Mehanizmi ovih procesa uključuju transkripcijske čimbenike kao što su NF- $\kappa$ B i AP-1 (engl., *activator protein-1*) i mnoge druge puteve prijenosa signala u stanicama (razne proteinske kinaze). Oksidacijskim stresom usmjerena epigenetska regulacija vodi do pojačane ekspresije gena koji igraju ulogu u upalnim procesima. Također, veliku ulogu ima redoks ravnoteža stanica koja biva narušena oksidacijskim stresom. Jedan od najvećih doprinosa oksidacijskom stresu u plućima je dim cigareta. Oksidansi prisutni u dimu mogu poticati alveolarne makrofage na ispuštanje dodatnih reaktivnih vrsta kisika i mnoštvo tvari koje potiču upalne procese te privlače neutrofile. U pluća pušača migrira znatno više i makrofaga s većom gustoćom granula u citoplazmi i neutrofila koji dodatno potiču upalne procese i proizvode još oksidansa. Ovome doprinose i slobodni katalitički ioni željeza ( $\text{Fe}^{3+}$ ) iz dima te pojačano lučenje iona željeza iz makrofaga potiče stvaranje ROS-a u tekućini koja oblaže sluznice pluća i dišnih puteva. Također je pokazana korelacija povećanog broja neutrofila u plućima s povećanim brojem ROS-a u perifernom krvotoku tijekom akutnih pojačanja COPD-a te smanjenje volumena izdaha u jednoj sekundi (engl., *forced expiratory volume*, FEV<sub>1</sub>). Cigaretni dim također doprinosi povećanju RNS-a te povećanju procesa nitracije proteina, ali ipak glavnu ulogu igra kisik i peroksidacija lipida (Rahman i sur., 2006).

Važni produkti peroksidacije lipida su malondialdehid, F<sub>2</sub>-izoprostani, akrolein i prije spomenuti 4-HNE. Ovi produkti oštećuju membrane, inaktiviraju mnoge membranske receptore i enzime te na taj način sudjeluju u mnogim bolestima, a naročito veliku ulogu igraju

upravo u kroničnim bolestima pluća. Osim ovih citotoksičnih svojstava, lipidni peroksidi utječu i na mnoge signalne puteve koji vode do upalnih procesa u plućima (Rahman i sur., 2006).

F<sub>2</sub>-izoprostani nastaju *in situ*, a počinju djelovati kada ih fosfolipaze oslobode iz membrane. Mehanizam njihova djelovanja radi preko specifičnih prostaglandin receptora. 4-HNE djeluje kao elektrofil, a osim svojih uloga u abnormalnoj regulaciji apoptoze i proliferacije, sudjeluje i u brojnim signalnim putevima. Može se vezati direktno na proteine jer ima veliki afinitet za cistein, histidin i lizin, a djeluje aktivirajuće na sintezu GSH preko djelovanja na gene za cistein ligazu, važan enzim u sintetskom putu GSH. Također potiče ekspresiju raznih upalnih gena, interleukin 8 (IL-8), monocitni kemoatraktni protein 1 (engl., *monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) i mnoge druge. Akrolein je aldehid koji reagira s tiolima, a prisutan je i u raznim okolišnim izvorima, npr. dim cigareta. Djeluje kao inhibitor sinteze GSH pa dodatno narušava redoks ravnotežu stanice i pridonosi upalnim procesima te potiče pojačanu aktivnost makrofaga djelovanjem na molekule izvanstaničnog matriksa. Akrolein može imati i kancerogeno i mutageno djelovanje jer se može direktno vezati na DNA (Rahman i sur., 2006).

GSH (ili GSSG u oksidiranom obliku) važan je u održavanju redoks ravnoteže u stanici. Pri normalnim uvjetima količina GSSG-a je oko 100 puta manja od količine GSH u stanici. Ovaj omjer se narušava kao posljedica oksidacijskog stresa te utječe na mnoge stanične procese pa tako i na ekspresiju gena. Kao odgovor na stres, stanice mogu reducirati dodatni GSSG uz utrošak NADPH ili ga izlučivati, ali je za oporavak od stresa vrlo važna *de novo* sinteza GSH. Produkti oksidacijskog stresa uzrokuju i povećanu ekspresiju enzima koji sudjeluju u sintezi GSH što je prilagodba stanica za svladavanje stresa. Pojačana koncentracija GSSG-a aktivira mnoge transkripcijske čimbenike, među kojima je i NF-κB, koji dalje aktiviraju upalne procese i potiču transkripciju tvari koje dodatno potiču upalu (Rahman i sur., 2006).

Transkripcijski čimbenik NF-κB je posebno važan, upravo kod plućnih bolesti, jer ga mogu aktivirati mnogi okolišni i unutar stanični čimbenici (i neki signali upale, npr. IL-1β). NF-κB djeluje na mnoštvo upalnih gena, ali i na brojne druge transkripcijske čimbenike i signalne molekule. Mehanizam samog djelovanja NF-κB je acetilacija, a jedna od njegovih podjedinica pripada i u histon acetilaze. Oksidacijski stres, uz aktivaciju NF-κB, potiče i njegovu translokaciju u jezgru gdje se može vezati za DNA i poticati ekspresiju gena. Histon deacetilaze također utječu na aktivnost NF-κB, ali točni mehanizmi ovog djelovanja nisu poznati te postoji više teorija koje su međusobno konfliktne (Rahman i sur., 2006).

Mnogi novi lijekovi razvijaju se tako da djeluju ciljano na redoks ravnotežu u stanici te pokušavaju vratiti normalnu ekspresiju gena i ublažiti ili zaustaviti upalne procese kod COPD-a. Uglavnom se koriste antioksidansi u kombinaciji s već poznatim oblicima liječenja i često uz promjenu prehrane. Jedan od spojeva koji pokazuje dobre rezultate u prvim kliničkim istraživanjima je N-acetil-L-cistein (NAC) te njegova lizinska sol, N-acistelin (NAL) koji ima slično djelovanje ali uz manje nuspojava (Rahman i sur., 2006).

## 5. Oksidacijski stres i epigenetska regulacija u ostalim bolestima

Osim u onkogenezi i progresiji te kroničnim plućnim bolestima oksidacijski stres ima znatnu ulogu i u raznim drugim kroničnim bolestima. To uključuje i mnoge bolesti povezane uz starenje, uglavnom bolesti krvožilnog i živčanog sustava (Cencioni i sur., 2013).

Kardiovaskularne bolesti najveći su uzročnik smrti u zapadnim državama, a jedan od pokretača je starenje endotela krvnih žila. Važan čimbenik za održavanje pravilne homeostaze krvnih žila je dušikov (II) oksid (NO) kojeg u ovom slučaju proizvodi endotelna sintaza dušikovog oksida (engl., *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS). NO kontrolira vazodilataciju, pomaže u nošenju s oksidacijskim stresom, sprječava koagulaciju krvi i upalne procese u žilama. Za održavanje pravilne ekspresije gena u krvnim žilama važna je histon deacetilaza SIRT1 čiju aktivnost potiče i NO. Tijekom starenja endotelne stanice i uslijed oksidacijskog stresa smanjuje se eNOS aktivnost te se proizvodi manje NO. Ovime je dodatno ubrzano starenje endotela žila (Cencioni i sur., 2013).

Živčani sustav, a pogotovo mozak koji sadrži puno lipida podložnih peroksidaciji, nema naročito dobro razvijene mehanizme obrane od oksidacijskog stresa. Starenjem se također smanjuje aktivnost antioksidantnih enzima te je učinak oksidacijskog stresa sve jači (Uttara i sur., 2009). Alzheimerovu bolest karakteriziraju nakupine amiloida i visoko fosforiliranih tau proteina između stanice, a očituje se gubitkom pamćenja i kognitivnih sposobnosti. U novije vrijeme je otkriveno i opće prihvaćeno da je oksidativno oštećenje DNA jedan od prvih znakova Alzheimerera. Ovo karakteristično oštećenje DNA prisutno je i u mozgu i u perifernim tkivima već u ranim stadijima Alzheimerera. Najčešći oblik oštećenja DNA je oksidacija gvanina u 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozin. Zbog ovog oštećenja je poremećeno vezanje i utjecaj transkripcijskih čimbenika na DNA te je poremećen ekspresija gena. Uz oksidaciju gvanina, i citozin u CpG otocima je također često i metiliran, a pripadajući H2A histoni su fosforilirani. Zbog ovoga, a posebno zbog metilacije, nije moguće napraviti popravke oksidiranog gvanina te se oštećenja šire (Cencioni i sur., 2013).

## 6. Zaključak

Sve većim razumijevanjem velike uloge oksidacijskog stresa na epigenetiku te njihov zajednički učinak na promjene ekspresije gena u kroničnim bolestima usmjeruje i razvoj novih terapija i lijekova koji ciljano djeluju upravo na ove mehanizme. Brojna istraživanja usmjerena su na utjecaje inhibitora enzima koji mogu uzrokovati poremećaje u epigenetskoj regulaciji. Jedni od najvažnijih enzima su histon deacetilaze koje imaju izuzetno velik učinak u mnogim patološkim stanjima. Njihov utjecaj na acetilom je važan i u normalnim stanjima, ali često je baš učinak hiperdeacetilacije histona i drugih proteina ključan za nastanak i razvoj bolesti. Oksidacijski stres također ima ulogu u upalnim procesima i u starenju te uzrokuje mnoga oštećenja DNA i abnormalnu epigenetsku regulaciju u mnogim bolestima. Bolesti u kojima se ovo očituje uglavnom su bolesti zapadne civilizacije povezane upravo sa starenjem, npr. razni tumori, COPD, kardiovaskularne bolesti i bolesti živčanog sustava.

## 8. Literatura

- Cencioni, C., Spallotta, F., Martelli, F., Valente, S., Mai, A., Zeiher, A., & Gaetano, C. (2013). Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *International journal of molecular sciences*, 14, str. 17643-17663
- Chi, P., Allis, C. D., & Wang, G. G. (2010). Covalent histone modifications—miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature reviews cancer*, 10, str. 457–469
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews genetics*, 8, str. 286–298
- Malireddy, S., Kotha, S. R., Secor, J. D., Gurney, T. O., Abbott, J. L., Maulik, G., Maddipati K. R. & Parinandi, N. L. (2012). Phytochemical antioxidants modulate mammalian cellular epigenome: implications in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17, str. 327-339
- Parbin, S., Kar, S., Shilpi, A., Sengupta, D., Deb, M., Rath, S. K., & Patra, S. K. (2014). Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62, str. 11-33
- Rahman, I., & Adcock, I. M. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *European respiratory journal*, 28, str. 219-242



- Schreck, R., Albermann, K. A. J., & Baeuerle, P. A. (1992). Nuclear factor kB: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free radical research communications*, 17, str. 221-237
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31, str. 27-36
- Tsai, M. M., Wang, C. S., S, C. Y., Huang, H. W., Chi, H. C., Lin, Y. H., ... & Lin, K. H. (2016). Potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets of microRNAs in human gastric cancer. *International journal of molecular sciences*, 17, str. 945 - 981
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7, str. 65-74
- Vallot, C., Stransky, N., Bernard-Pierrot, I., Hérault, A., Zucman-Rossi, J., Chapeaublanc, E., ... & Southgate, J. (2010). A novel epigenetic phenotype associated with the most aggressive pathway of bladder tumor progression. *Journal of the National Cancer Institute*, 103, str. 47-60

<https://www.copdfoundation.org/What-is-COPD>

## 10.Sažetak

Oksidacijski stres utječe negativno na procese u stanici, očituje se i kao starenje stanica te utječe na epigenetsku regulaciju. Sve je jasnije da su ovi procesi jako važni u raznim kroničnim bolestima te se pogrešnom kontrolom ekspresije gena omogućuje nastanak i progresija bolesti. Ovaj rad je kratki pregled epigenetskih mehanizama i utjecaja oksidacijskog stresa na određene kronične bolesti. Poseban osvrt stavljen je na histon deacetilaze i njihov utjecaj na procese razvoja tumora te na utjecaj oksidacijskog stresa kod kroničnih bolesti pluća.

## 11.Summary

Oxidative stress negatively affects cellular processes, presents itself as cell ageing, and affects epigenetic regulation. It's becoming more and more clear that these processes are very important in a variety of chronic diseases and that abnormal control of gene expression allows initiation and progression of disease. This paper is a short overview of epigenetic mechanisms and effects of oxidative stress on certain chronic diseases. A special focus is put on histone deacetylases and their effect on development and progression of cancer, and the effect of oxidative stress on chronic lung disease.